

- Smith, D.R. (2009). Preventing Calf Scours with the Sandhills Calving System. <http://nvdls.unl.edu/extension/neonatal%20scours%20Smith%20010208.pdf>. Pp. 6. Consulta: octubre de 2009.
- Stewart, S.; Godden, S.; Bey, R.; Rapnicki, P.; Fetrow, J.; Farnsworth, R.; Scanlon, M.; Arnold, Y.; Clow, L.; Mueller, K.; Ferrouillet, C. (2005). Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage and feeding of fresh bovine colostrum. *J. Dairy Sci*; 88: 2571-2578.
- Stull, C.; Reynolds, J. (2008). Calf Welfare. *Vet. Clinics Food Anim. Practice*. 24: 191-203.
- UCDAVIS. (1998). Section 1. Calf Care From Birth To Weaning. In: Dairy Care Practices: Animal Care Series, Dairy Workgroup University of California Cooperative Extension. www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/inf-da/inf-da_careprax.html. Consulta: octubre de 2009.
- Van Amburgh, M. (2008). Early Life Management and Long-term productivity of Dairy Calves (p. 5). Department of Animal Science. Cornell University, Ithaca, NY. http://www.rennut.com/Bucknell/Bucknell08_PDFs/Bucknell_Calf_Van_Amburgh_2008.pdf. Consulta: octubre de 2009.
- Wells SJ.; Dargatz, D.A.; Ott, S.L. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Prev. Vet. Med*. 29: 9-19.

CAPÍTULO 2

EL ECOSISTEMA RUMINAL Y LOS MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO

*Carlos Augusto Ospina. M.Sc.
Fernando Rodríguez. PhD.*

I. EL AMBIENTE RUMINAL

La simbiosis entre el animal y los microorganismos deriva en un sistema de cooperación en el cual ambos se benefician: el animal se favorece con la disponibilidad de compuestos (producto de la actividad microbiana) fáciles de asimilar, y los microorganismos se benefician de las condiciones ambientales (rumen) y suministro de energía que les brinda el animal (Hobson, 1997). En los rumiantes, a diferencia de otros mamíferos, los alimentos están sujetos a fermentación microbiana en el rumen antes de pasar por el verdadero estómago y el tracto intestinal, donde normalmente ocurre la digestión en la mayoría de los mamíferos (Van Soest, 1994). La rumia activa el flujo de saliva, el cual mantiene un pH favorable para los microorganismos y el animal; el flujo de saliva, junto con las contracciones musculares, mezclan los alimentos y los microorganismos; este proceso a su vez permite lavar el epitelio ruminal con los fluidos de la fermentación llevando nutrientes hacia estas superficies y retomando otros metabolitos y poblaciones microbianas que allí habitan hacia el contenido ruminal (Russell y Rychlik, 2001).

El rumen es una cámara de fermentación con capacidad de 100 a 150 litros en bovinos, en la cual se almacenan los alimentos que ingiere el herbívoro; allí, los alimentos son fermentados por un complejo poblacional anaerobio de tipo microbiano (Dehority, 1993). Estos microorganismos colonizan rápidamente y digieren de manera eficaz las partículas

alimenticias, las que al ser rumiadas aumentan el área superficial expuesta a ser degradada y el rango de fermentación (Russell y Rychlik, 2001). Es importante resaltar que el rumen no es un órgano glandular, razón por la que no secreta enzimas digestivas, y la degradación del alimento es llevada a cabo por una población microbiana constituida principalmente por bacterias, protozoos y hongos ruminales.

La población microbiana del rumen está conformada aproximadamente por 10^{10} bacterias, 10^6 protozoos ciliados y 10^5 hongos por mL, los cuales degradan y metabolizan los alimentos (proteínas, carbohidratos estructurales y grasas) produciendo ácidos grasos volátiles (AGVs), proteína microbiana, vitaminas, dióxido de carbono, metano y amoníaco (Bryant y Robinson, 1968). Los AGVs y constituyentes de las células microbianas, como proteínas y vitaminas, son utilizados como fuente de energía: carbono y nitrógeno para los procesos metabólicos endógenos que ocurren en el animal.

Fermentación ruminal

La fermentación en el rumen es el resultado de actividades físicas, químicas y microbiológicas, las cuales convierten componentes de la dieta –por medio de la degradación de estos sustratos– en productos como los ácidos grasos volátiles, proteína microbiana y vitaminas, principales fuentes de energía para el animal. En los rumiantes, las poblaciones microbianas se mantienen en el rumen gracias al regular abastecimiento y masticación de alimentos, la adición de buffers que provienen de la saliva y la remoción de ácidos producidos mediante un rápido flujo hacia fuera del rumen (Owens y Goetsch, 1993).

Ácidos grasos volátiles

El desarrollo ruminal es principalmente influenciado por la absorción y metabolismo de los ácidos grasos volátiles en el rumen, los cuales son producidos por los microorganismos; entre ellos se encuentra el ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico (estos son absorbidos y metabolizados por el epitelio del rumen). Cada uno de estos ácidos tiene una estimulación distinta: el ácido butírico, por ejemplo, estimula el desarrollo del epitelio ruminal, como también sucede con epitelios constituyentes del duodeno, colon y otros compartimentos del tracto gastrointestinal de rumiantes y monogástricos (Biagi *et al.*, 2007). En contraste, el ácido propiónico se constituye a nivel hepático en la mayor fuente de gluconeogénesis, y por ende de energía para el rumiante.

Ecosistema ruminal

El ambiente del compartimento ruminal es complejo y presenta características y condiciones óptimas de temperatura, presión osmótica, potencial de óxido-reducción y pH, para el

adecuado crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas que conforman el ecosistema ruminal. Las especies microbianas del rumen habitan en un ambiente anaerobio; sin embargo, a nivel y en cercanías de los epitelios que revisten internamente la pared del rumen, existen microambientes menos anóxicos y con especies bacterianas más microaerófilas o facultativas. El ecosistema microbiano presente en el rumen lo conforman microorganismos, entre los que se encuentran protozoos, hongos y bacterias, especializados en fermentar y degradar en consorcio los alimentos que los animales consumen (Karnati *et al.*, 2003).

Alteraciones en la composición de esta microbiota, cantidad o actividad específica de cada población o de especies individuales, podrían proveer el potencial para el mejoramiento en la producción animal y ayudarían en la reducción de los impactos ambientales negativos que generan las actividades agrícolas.

II. POBLACIONES MICROBIALES DEL RUMEN

La dieta que los animales consumen es el factor más determinante en la variación de las poblaciones microbiales del rumen y su prevalencia. En síntesis, el número relativo de las diferentes especies de microorganismos en el rumen varía con la composición y estructura del alimento que el animal consume (Rodríguez, 2003), de tal modo que sustratos alimenticios fibrosos favorecen el crecimiento de microorganismos lignocelulolíticos mientras que los almidones promueven la abundancia de bacterias amilolíticas, como *Prevotella bryantii*, *Ruminobacter amylophilus*, *Streptococcus bovis* y *Selenomonas ruminantium*.

Bacterias ruminales

Existen diversos grupos de bacterias en el rumen: bacterias libres en el medio líquido (aproximadamente 30%), bacterias adheridas a las partículas alimenticias (cerca de un 70%), bacterias adheridas al epitelio ruminal y bacterias adheridas a protozoarios (Vogels *et al.*, 1980).

Las bacterias ruminales (Figura 7) son clasificadas en lipolíticas, peptidolíticas, amilolíticas, proteolíticas, deaminativas, hemicelulolíticas y celulolíticas; denominadas así por su actividad metabólica específica y de acuerdo al sustrato sobre el cual actúan (Stewart *et al.*, 1997). Las especies microbiales que utilizan polisacáridos estructurales (celulosa-hemicelulosa) como su mayor fuente de energía, son capaces de generar los nutrientes que el animal necesita para su sobrevivencia, crecimiento y producción. No obstante, aquellas que utilizan carbohidratos solubles, como azúcares y almidones, podrían ser molécula a molécula más eficientes en términos de balances energéticos, dado que uno de sus principales productos de fermentación es el ácido propiónico (Cotta, 1988).



Figura 7. Bacteria ruminal *Oscillospira guillermoidii*, observada a través de microscopía de contraste de fases.

Principales bacterias celulolíticas

Las principales especies celulolíticas son: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, y *R. flavefaciens* que fermentan sustratos de alta complejidad, mientras algunas cepas de *R. albus* pueden utilizar solo sustratos en los cuales la celulosa se presenta de una manera amorfa (Stewart *et al.*, 1997).

- ***Fibrobacter succinogenes*** es una bacteria Gram-negativa, con alrededor de 0,8 a 1,6 μm de diámetro. Se considera una de las bacterias celulolíticas que se encuentra en mayor proporción en el rumen y que presenta mayor capacidad de degradación de materiales fibrosos y forrajes de difícil digestión (Jun *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008).
- ***Ruminococcus flavefaciens*** es un coco estrictamente anaerobio no motil, que posee una ultra estructura de pared celular Gram-positiva y que es reconocido entre las bacterias más activas involucradas en la degradación de la fibra de plantas en el rumen (Margret *et al.*, 2009). Esta bacteria mide entre 0,7-1,6 μm de diámetro y puede degradar formas recalcitrantes de celulosa; además, muestra un extensivo glicocáliz, el cual puede tener un importante papel en la adhesión de células a sustratos lignocelulósicos (Rincón *et al.*, 2010).

Hongos anaeróbicos ruminales (HAR)

Los hongos ruminales requieren de una temperatura de 39° C, pH 6,5, ausencia de oxígeno y presencia de CO₂ para su óptimo crecimiento (Orpin, 1988). Una abundante digestión

de los componentes fibrosos de las plantas por parte de los hongos anaeróbicos ha sido claramente comprobada en experimentos *in vitro* (Akin y Risby, 1987). Estos hongos han demostrado poseer un amplio rango de enzimas que pueden degradar los principales carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) de las paredes celulares de plantas (Figura 8) (Matsui y Ban-Tokuda, 2008). Al igual que para las bacterias ruminales, existen diferencias entre los diversos géneros de hongos anaeróbicos en cuanto a la utilización de los distintos sustratos presentes en el animal.

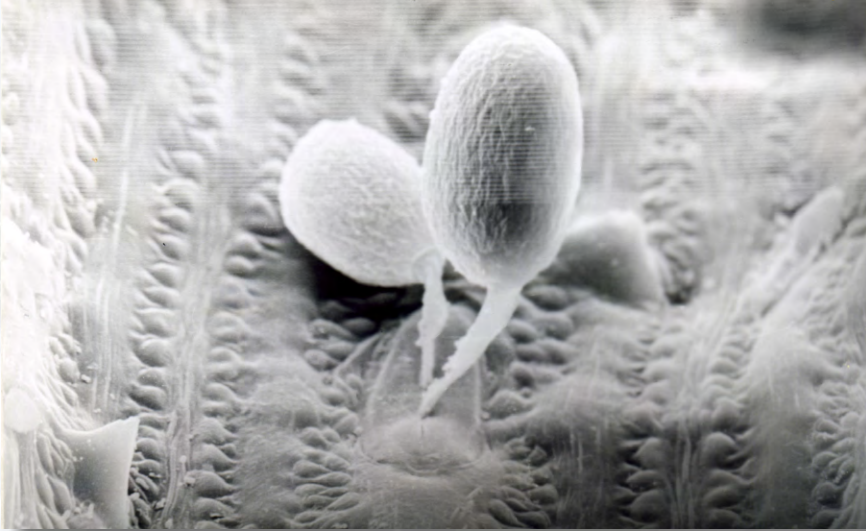


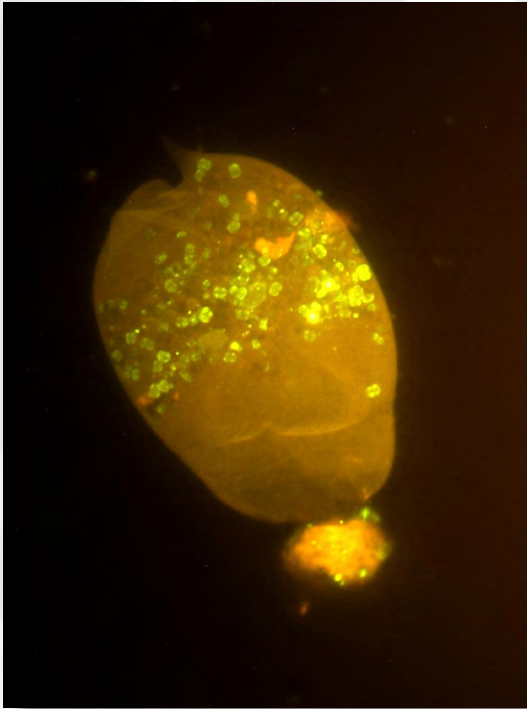
Figura 8. Hongos anaerobios ruminales colonizando y creciendo en la puerta de entrada de un estoma vegetal.

III. INTERACCIONES MICROBIANAS EN EL RUMEN Y BALANCES DE ENERGÍA

La misma naturaleza compleja de los sustratos alimenticios que caracterizan la dieta de los ruminantes, exige que consorcios, en lugar de especies microbianas individuales, definan el aprovechamiento de los mismos y el respectivo flujo de nitrógeno y de energía dentro del rumen. Para degradar la fibra de pastos y forrajes los HAR son determinantes, ya que mediante una acción física y enzimática abren el acceso a comunidades bacterianas especializadas en penetrar estos espacios y continuar con la actividad fibrolítica iniciada por la comunidad fúngal (Wolin *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2007). Bacterias celulolíticas, hemicelulolíticas y pectinolíticas son las llamadas a integrar una mezcla enzimática sin precedentes en la naturaleza, que de manera sucesiva y en sinergia rompen los enlaces que unen los monómeros de la pared celular a todo nivel.

No se ha documentado aún si los colonizadores bacterianos del rumen armonizan su trabajo degradativo de la pared celular vegetal a través de mecanismos como 'quorum sensing', ni tampoco cómo es el orden de la sucesión ecológica –si lo hay– que va colonizando y degradando la fibra. Lo fundamental es que se requieren todos los actores, y que su efectividad podría estar ligada a su abundancia o grado de especiación, al tipo de rumiante, al tipo de dieta que consume y al ambiente en el cual este se encuentra.

Otras interacciones de tipo simbiótico podrían beneficiar a dos tipos de microorganismos diferentes dentro del ecosistema ruminal; este es el caso de la interacción celulolíticas-metanogénicas, en donde las primeras son las proveedoras de iones hidrógeno (H^+), los cuales sirven de insumos para la construcción metabólica de metano por parte de géneros como *Methanobrevibacter*. Las bacterias celulolíticas, como *Ruminobacter* sp, no solo utilizan a las metanogénicas como vertederos de los excesos de estos iones, sino a otras especies no metanogénicas de la comunidad que pueden utilizarlos en la construcción de otras moléculas. Así, por ejemplo, muchos de los hidrogeniones que no son utilizados por las metanogénicas bien podrían ser utilizados por otras especies bacterianas para generar lactato, etanol, o AGVs, que finalmente son absorbidos y utilizados por el rumiante. Algunas bacterias como *Sarcina* sp colonizan la superficie de los protozoarios ruminales y desde allí capturan hidrogeniones (H^+) para su posterior conversión a metano (Figura 9).



Dentro del rumen, unas especies bacterianas podrían convertirse para otras en la fuente de suministro de componentes esenciales como vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos de cadena ramificada. Otras interacciones podrían influenciar el flujo de carbono, la densidad poblacional de un grupo microbiano en particular y la cadena trófica de nutrientes en el rumen; entre ellas: la predación protozoario-protozoario, la predación protozoario-bacteria, y la predación protozoario-zoospora fungal (Dehority, 1998).

Figura 9. Células bacterianas tipo *Sarcina* sp formando una biopelícula sobre la superficie de un protozoario ruminal.

IV. COLONIZACIÓN MICROBIANA Y DESARROLLO RUMINAL

Al igual que en otros mamíferos el establecimiento y composición de la microbiota en un rumiante es el resultado de una sucesión ecológica que comienza desde el nacimiento y que gradualmente evoluciona en composición y distribución durante el crecimiento. En un animal (rumiante o monogástrico) la sucesión ecológica microbiana progresará con la exposición a diferentes cambios en la alimentación, y podría mostrar una marcada diferencia en términos de diversidad a nivel de género, especie y cepa, al igual que en abundancia a través de los diferentes compartimientos del tracto gastrointestinal (Gong *et al.*, 2002a; Gong *et al.*, 2002b). El rumen como órgano central de los herbívoros poligástricos también experimenta una colonización microbiana gradual, en cuya sucesión ecológica los iniciadores son bacterias de tipo anaerobio facultativo y algunas pocas aerobias. *Escherichia coli* y bacterias tipo *Enterococcus* se cuentan entre los primeros colonizadores (Lukàs *et al.*, 2007). A medida que el rumen madura, las anaerobias predominan y las facultativas como *Lachnospira* sp comienzan a restringirse a aquellas áreas donde las tensiones parciales de oxígeno son altas y ocurre una rica irrigación sanguínea. Estas áreas corresponden principalmente a los epitelios que revisten la pared ruminal, normalmente zonas también de activo intercambio gaseoso, moléculas y ácidos orgánicos (Cheng y McAllister, 1997).

Bacterias productoras de ácido láctico y bacterias utilizadoras de este metabolito podrían aflorar durante las primeras semanas del recién nacido. Pero a medida que el suministro de leche comienza a restringirse, su abundancia y diversidad podría también verse disminuida para dar paso a otros consorcios más relacionados con la presencia de nuevos sustratos dietarios (Anderson *et al.*, 1987). Bifidobacteria y *Lactobacilli* se constituyen en los microorganismos más hábiles en sobrevivir el paso por el ambiente ácido del estómago, y en general dominan todos los compartimientos a lo largo del tracto gastrointestinal de jóvenes terneros. Entre estas bacterias ácido lácticas se ha encontrado que es Bifidobacteria la más dominante a nivel de flora cecal, reportando hasta un 10% de los conteos de bacterias totales (Vlková *et al.*, 2006).

En la transición hacia un ambiente más anaeróbico y una dieta con más contenido de fibra, el ternero podría experimentar una sucesión ecológica que trasloca un consorcio microbiano rico en géneros como *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* y *Lachnospira* hacia un consorcio dominado por *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* y *Prevotella* (Figura 10).

Beharka *et al.* (1998) presentaron resultados que indican que la forma física de la dieta (entera o molida) podría tener un efecto significativo en el desarrollo microbiano y anatómico (forma y tamaño de papila) del rumen de terneros neonatos; de tal modo que el ingreso de

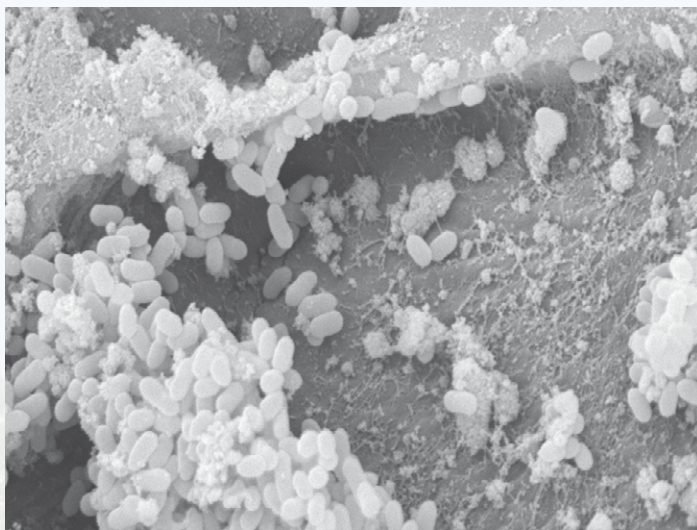


Figura 10. Colonización de partículas de alimento por parte de la bacteria ruminal *Prevotella bryantii*.

material fibroso al compartimento ruminal es determinante en el establecimiento y desarrollo de poblaciones fibrolíticas (sin querer decir que estas u otras especies del rumen no se hayan establecido previamente). Para dar claridad a este evento, se debe pensar que las bacterias del ecosistema ruminal, como muchas especies de otros ambientes, son altamente diversas y versátiles en términos de utilización de nutrientes, específicamente de nutrientes diferentes a los cuales ellas han mostrado por evolución su máxima capacidad adaptativa. Su diversidad metabólica y dietaria explica entonces, para el caso del rumen, por qué un animal en una dieta que suprime al máximo la disponibilidad de carbohidratos estructurales podría aún mantener microorganismos celulolíticos que sobrevivirán a esta condición gracias a la utilización de otras fuentes de carbono o al “cross-feeding”, entre otras especies microbiales del consorcio ruminal.

Por su parte, Belanche *et al.* (2010) reportaron un incremento en la concentración de la bacteria celulolítica *R. flavefaciens* en el rumen de terneros de 30 días de edad, y la presencia en menor número de *R. albus*. Otros microorganismos abundantes en este periodo fueron protozoarios del género *Entodinium* y miembros de la subfamilia Isotrichiidae. *Prevotella ruminicola* fue la bacteria más abundante en animales de 90 días de edad, más que en aquellos de 30 y 45 días.

Previamente, Ospina *et al.* (2009) monitorearon la presencia de *P. bryantii* en jóvenes terneros, encontrando una cantidad significativa a los 20 y 40 días de edad. *P. bryantii* no solo ha sido reportada como una de las bacterias más abundantes en el rumen, sino una de las más adaptables a un amplio rango de dietas gracias a su alta versatilidad metabólica.

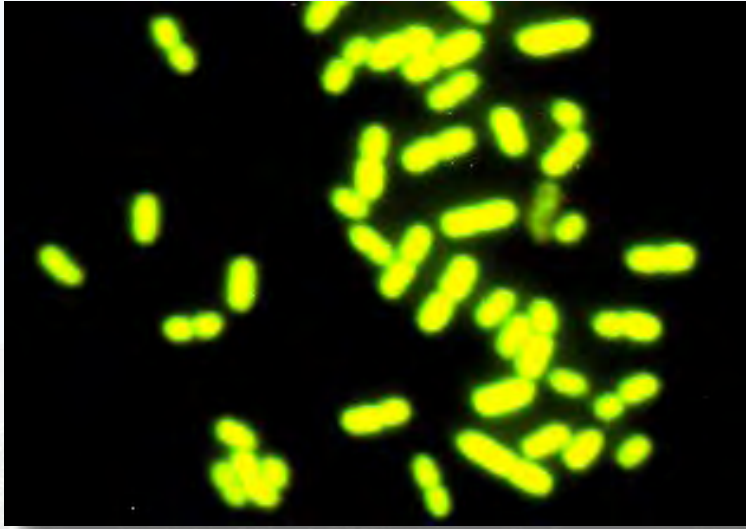


Figura 11. Bacteria ruminal *Prevotella bryantii*, observada a través de microscopía de epifluorescencia.

Bacterias utilizadoras de lactato y butirato ruminal.

Las bacterias utilizadoras de lactato son unas de las primeras colonizadoras del rumen que a través de su actividad metabólica permiten la producción y acumulación significativa de butirato en dicho compartimiento. El butirato, por su conocido efecto en la replicación del ADN, podría elicitar la división celular y un consecuente crecimiento tisular (desarrollo de papila) en el revestimiento interno del rumen. Si el epitelio madura y se estratifica, aumentan las posibilidades de absorción de este órgano, y en concordancia con el uso de sustratos ricos en celulosa –al igual que concentrados y carbohidratos solubles– comenzará la movilización de ácidos grasos volátiles a través del revestimiento celular. Estos compuestos, como el propionato, se trasladarán a órganos como el hígado, constituyéndose en la principal fuente de gluconeogénesis para el rumiante.

Zitnan *et al.* (2005) han puntualizado que el butirato no es la molécula directamente correlacionada con la longitud de la papila ruminal, y que su extensión anatómica está más ligada a la concentración del factor de crecimiento insulínico tipo I, el cual es directamente dependiente de los niveles de la hormona del crecimiento.

Poco conocimiento se tiene acerca de la comunicación entre los microorganismos ruminales y las células que revisten el epitelio ruminal. Recientes evidencias apuntan a que receptores tipo Toll juegan en el duodeno de monogástricos como una vía de comunicación entre enterocitos y células microbiales, y que de dicha interacción se desprenden respuestas,

entre ellas la secreción de la inmunoglobulina A, la producción de péptidos antimicrobiales y una consecuente proliferación celular en el epitelio. No hay para el rumen hasta ahora evidencias de la existencia de un aprendizaje mutuo entre epitelio y comunidad microbiana o sus productos metabólicos, y por lo tanto si este órgano tiene la capacidad de distinguir entre quién es de origen ruminal y quién no.

V. ADITIVOS MICROBIANOS PARA RUMIANTES

Desde el año 2006 quedó prohibida en la Unión Europea la utilización en alimentación animal de los antibióticos promotores de crecimiento, esto obedece principalmente al objeto de minimizar riesgos de resistencia microbiana a los medicamentos utilizados para tratar las infecciones bacterianas en medicina humana o veterinaria. Por esta razón se han desarrollado alternativas a este tipo de compuestos, entre los que se destacan los probióticos, los ácidos orgánicos, las enzimas y los extractos vegetales, siendo los probióticos los más conocidos y los que cuentan actualmente con mayor proyección comercial (Watson y Preedy, 2010).

Los probióticos se han definido como un suplemento alimenticio de microorganismos vivos que afectan de forma benéfica al animal hospedero para mejorar su balance microbial a nivel intestinal (Gebu *et al.*, 2010). Estos aditivos funcionales incluyen no solo cultivos microbiales viables, extractos de cultivo y preparaciones enzimáticas, sino también sus combinaciones (simbióticos). Los probióticos pueden combatir los efectos negativos del estrés porque previenen el establecimiento de los organismos patógenos y/o el restablecimiento de una microflora gastrointestinal benéfica (Kung, 2001). Es por esta causa que la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha exigido que los fabricantes de alimentos usen el término “direct-fed microbial” (DFM) en vez de ‘probiótico’ (Miles y Bootwalla, 1989).

Los microorganismos usados como DFM para rumiantes incluyen cultivos de hongos y bacterias (Krehbiel *et al.*, 2003). Las investigaciones en el área de DFM se han centrado en el concepto de organismos benéficos para animales estresados, con la hipótesis general de que ellos disminuirán o prevendrán el establecimiento intestinal de microorganismos patógenos (Vandevoorde *et al.*, 1991).

Modo de acción de los aditivos microbiales-probióticos

Algunas de las principales hipótesis de la forma en que los DFM benefician al animal se presentan en la Tabla 3 (Fuller, 1989). Una de las razones más comunes para explicar la mejora en la salud del rumiante cuando es alimentado con DFM, es que los microbios benéficos

compiten con los potencialmente patógenos y previenen su establecimiento; además, los aditivos microbiales producen sustancias antimicrobiales y ácidos que limitan el crecimiento de patógenos, y adicionalmente pueden metabolizar sustancias tóxicas y producir sustancias estimuladoras (Kung, 2001).

Tabla 3. Mecanismos propuestos para mejorar la fisiología animal cuando los rumiantes son alimentados con DFM

TIPO DE MECANISMO
Producción de compuestos antibacteriales (ácidos, bacteriocinas y antibióticos).
Competencia con organismos no deseados por colonización y/o nutrientes (exclusión competitiva).
Producción y/o estimulación de enzimas.
Metabolismo y/o detoxificación de compuestos no deseados.
Estimulación de una respuesta inmune en animal hospedero.
Producción de nutrientes (aminoácidos, vitaminas) y otros factores de crecimiento estimuladores del animal hospedero.

La existencia de los pre-estómagos como uno de los rasgos más característicos de los rumiantes, hace que el horizonte de los probióticos deba ser ampliado, extendiendo su radio de acción a los microorganismos ruminales. Surge de esta manera el concepto de ‘probiosis ruminal’, entendido como “la creación de condiciones que refuercen las poblaciones microbianas del rumen” (Watson y Preedy, 2010).

El ecosistema ruminal puede ser modificado para mejorar la eficiencia productiva del ganado bovino. Las estrategias de modificación que se usan comercialmente, o que hacen parte de las investigaciones actuales, incluyen la administración de compuestos microbianos, probióticos, inóculos de microorganismos ruminales naturales e inóculos de microorganismos ruminales recombinantes (Mackie *et al.*, 2002). La introducción de organismos naturales en el rumen se realiza con tres objetivos principales: la eliminación de compuestos tóxicos de origen vegetal, la prevención de la acidosis ruminal y el mejoramiento de la degradación de la fibra; factores que van a generar un mejor desarrollo y salud (Orpin y Joblin, 1997).

Aditivos ruminales de origen fungal

Los cultivos fungales vivos y sus extractos, particularmente de *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*, se han usado como aditivos alimenticios desde hace años, y están categorizados dentro de los aditivos microbianos alimenticios de uso directo. Estos aditivos

benefician la alimentación del rumiante desde el punto de vista de ganancia de peso vivo y producción de leche, en un rango similar a los ionóforos (mejoras del 7% u 8%; Wallace y Newbold, 1993), además de mejorar la digestibilidad total de los componentes de la dieta. La mejora en el consumo alimenticio parece deberse a una mejora en la tasa de ruptura de la fibra (Martin y Nisbet, 1992) y parcialmente por una mejora en el flujo duodenal de aminoácidos absorbibles. Se estima que del total de levaduras viables que ingresan en el rumen a través de un aditivo, de un 30% a 40% presentan signos de autólisis; el correspondiente 70% a 60% de levaduras sobrevivientes se encarga de la actividad metabólica, que mantienen por un tiempo aproximado de 48 horas (Dawson *et al.*, 1990). Puesto que durante dicho tiempo no se presenta división celular de estos microorganismos en el rumen, se requiere una administración diaria y continua de cultivos de levaduras.

Los efectos más reproducibles de los aditivos alimenticios microbianos es que ellos aumentan la cantidad de bacterias anaeróbicas viables recuperadas en el fluido ruminal. Incrementos de 50% a 100% son comunes (Wallace y Newbold, 1993), pero se han observado aumentos de más de 100% comparados con controles (Dawson *et al.*, 1990). La cantidad de bacterias celulolíticas se incrementa (Martin y Nisbet, 1992; Wallace y Newbold, 1993) y las bacterias que utilizan el ácido láctico son estimuladas por la presencia de ácido carboxílico, explicando en parte la mejora en la ruptura de la fibra y aumentando la estabilidad de la fermentación en animales que recibieron levadura y *A. oryzae* (Williams *et al.*, 1991).

Aditivos microbianos para reducir o prevenir la acidosis ruminal

La acidosis ruminal es un desorden metabólico que produce cambios en el ambiente ruminal, que alteran no solamente su función sino la composición y dinámica de las poblaciones microbianas ruminales. *Streptococcus bovis* y otras bacterias productoras de ácido láctico, como *Lactobacillus* sp, son más tolerantes a las condiciones ácidas producidas durante una rápida fermentación y las causantes directas de las caídas de pH ruminal. Cuando este pH ruminal desciende a niveles drásticos (por debajo de 5,5) por efecto de la acumulación excesiva de lactato y otros ácidos orgánicos producto de la fermentación rápida de carbohidratos solubles presentes en la dieta, el animal desarrolla una acidosis ruminal.

En la acidosis ruminal, los microorganismos Gram-positivos reemplazan parte de la comunidad de Gram-negativos, y establecen un ciclo continuo de producción de lactato en el rumen. Al mismo tiempo, organismos como *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium* comienzan a metabolizar parte del exceso del lactato acumulado, metabolizándolo principalmente a butirato. La proporción del cambio de la población puede ser influenciada por diferentes factores, pero esto se asocia con una sobreoferta de carbohidratos de fácil degradación. Los cambios pueden ser muy rápidos, y un sobrecrecimiento de bacterias ácido lácticas puede ocurrir en tan solo 24 horas (Owens *et al.*, 1998).

La incidencia de acidosis puede ser reducida por prácticas de manejo, las cuales dan tiempo para que el rumen se adapte a un incremento en la concentración de granos o de concentrados en la dieta. Lo anterior permite un crecimiento balanceado de poblaciones microbiales utilizadoras de lactato en el rumen, convirtiéndose en una estrategia para limitar la disfunción ruminal asociada con dietas altas en carbohidratos solubles. El uso de antimicrobiales como los ionóforos limita el crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico (Bergen y Bates, 1984; Salinas-Chavira *et al.*, 2010). Aditivos microbiales desarrollados con base en bacterias ruminales han mostrado así mismo un potencial en la prevención de este desorden metabólico; entre ellos se encuentra el uso de cultivos vivos de bacterias ruminales que utilizan ácido láctico, como *Meghasphaera elsdenii* y Propionibacteria, las cuales metabolizan directamente el lactato a butirato (Kung y Hession, 1995). Otros microorganismos ruminales, como *Prevotella bryantii*, han mostrado su potencial para reducir la acumulación de lactato a través de una competencia directa por nutrientes con las especies bacterianas que producen ácido láctico (Figura 12) (Rodríguez, 2003).

Microorganismos con potencial para mejorar el desarrollo ruminal de terneros

- **Bacterias ácido lácticas (BAL).** Dado que las bacterias ácido lácticas son unas de las primeras colonizadoras del tracto gastrointestinal de jóvenes terneros, estas podrían constituirse en una población atractiva para el desarrollo de probióticos. Las BAL son microorganismos de rápido crecimiento, con capacidades especiales, entre las que se relaciona su naturaleza antimicrobiana. A través de la producción de sustancias anti-

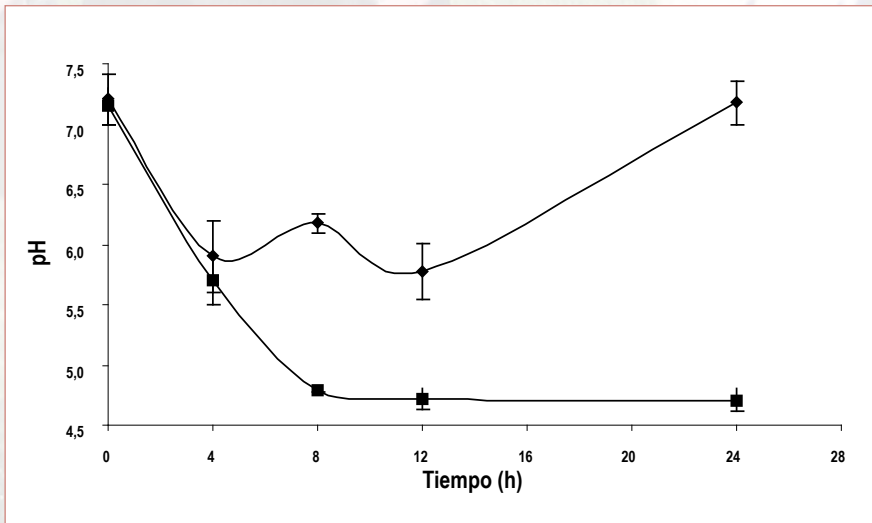


Figura 12. pH ruminal de cabras con acidosis [Control (■)] vs. animales inoculados con la bacteria *Prevotella bryantii* (◆).

crobiales, principalmente bacteriocinas, la secreción y acumulación de ácido láctico, las BAL colocan una barrera que excluye competitivamente la adhesión y proliferación de patógenos.

Vlková *et al.* (2006) encontraron Bifidobacteria como el grupo microbiano dominante en la flora fecal de terneros de 7 días de edad, lo cual se constituye en aproximadamente el 10% de las bacterias totales cuantificadas. En este estudio, la porción del tracto gastrointestinal con mayor abundancia de Bifidobacteria fue precisamente el rumen, seguido del ciego, el colón en menor número en duodeno y abomaso, y el duodeno. De acuerdo a estudios de Abe *et al.* (1995), los terneros que recibieron *Bifidobacterium pseudolongum* o *Lactobacillus acidophilus* presentaron una conversión alimenticia y una ganancia de peso corporal mayor que aquellos terneros no tratados.

- **Bacterias celulolíticas.** Manipular la función ruminal –especialmente la degradación de la fibra– a través del uso de microorganismos celulolíticos o de sus enzimas es un reto mayor en un animal adulto, dado principalmente a que el rumiante en su estado adulto tiene completamente definidas y adaptadas sus comunidades microbianas. Esto significa que cualquier nuevo microorganismo que ingrese (sea éste nativo, foráneo, o nativo modificado genéticamente), confrontará una alta competencia, no solo por disponibilidad de sustrato, sino por sitios de adhesión, para los cuales un microorganismo dependerá de capacidades previas, quizá no programadas, de comunicación celular e interacciones que los microorganismos residentes ya están seguramente manifestando en su máxima expresión. Podría entonces inferirse, al menos teóricamente, que un reto temprano del ternero con microorganismos celulolíticos, en lo posible de origen ruminal, daría una mayor posibilidad de colonización y establecimiento.
- **Otros microorganismos.** Hallazgos reportados por Lukàs *et al.* (2007) han demostrado que la sucesión microbiana inicial en el rumen de terneros que protagonizan Bifidobacteria y *E. coli* es continuada en números importantes por especies relacionadas con el género *Bacteroides*, *Clostridium* y *Faecalibacterium*. En humanos y en diferentes monogástricos se han publicado ampliamente las características fisiológicas, que hacen de especies tales como *Bacteroides thetaiotetramicrum* una de las más benéficas bacterias del tracto gastrointestinal.

La reciente secuenciación (Xu *et al.*, 2010 / en proceso de publicación) de su genoma podría develar nuevas características, hasta hoy desconocidas, que confirmarían su condición como bacteria probiótica. Sin embargo, dado que en la actualidad aún no se conoce la estructura poblacional del género *Bacteroides* en terneros, no se puede determinar si esta u otras especies podrían constituirse en los candidatos más importantes para el desarrollo de probióticos de acción ruminal.

Acción probiótica de aditivos microbiales en terneros

Varios microorganismos han sido probados en su capacidad para ejercer un efecto benéfico en terneros, aunque pocas evidencias apoyan un efecto positivo directo. Quizá se ha obviado equivocadamente el hecho de que organismos foráneos al rumen podrían tener limitada capacidad de colonizar y establecerse ejerciendo un efecto funcional en y desde el saco ruminal. Aún si su origen fuera nativo (ruminal), existiría una alta competencia con los otros residentes microbiales que están llegando a este órgano por efecto de la sucesión ecológica natural. Cuando bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, al igual que cepas de *Streptococcus faecium*, *Aspergillus oryzae* y *Bacillus subtilis*, fueron suministradas como probiótico a jóvenes terneros, estas no mostraron efecto alguno en parámetros de producción, como ganancia de peso o crecimiento; tampoco para los animales tratados se encontró un efecto en el consumo de alimento (Windschilt *et al.*, 1991).

Alternativamente al uso de microorganismos viables, se ha explorado también la posible actividad benéfica de sus constituyentes celulares. En tal sentido, Muscato *et al.* (2002) mostraron una reducción significativa en la incidencia de diarreas en terneros tratados con polisacáridos de origen bacteriano ruminal, al igual que con contenido ruminal previamente esterilizado. El uso de mezcla microbiana viable de origen ruminal con actividad probiótica, estudiada por Aldana *et al.* (2009), resultó también en una disminución en la incidencia de diarreas cercanas a un 60% en terneras Holstein (Figura 13), lo cual pone en evidencia el potencial probiótico de los microorganismos de origen ruminal (células vivas o muertas) y

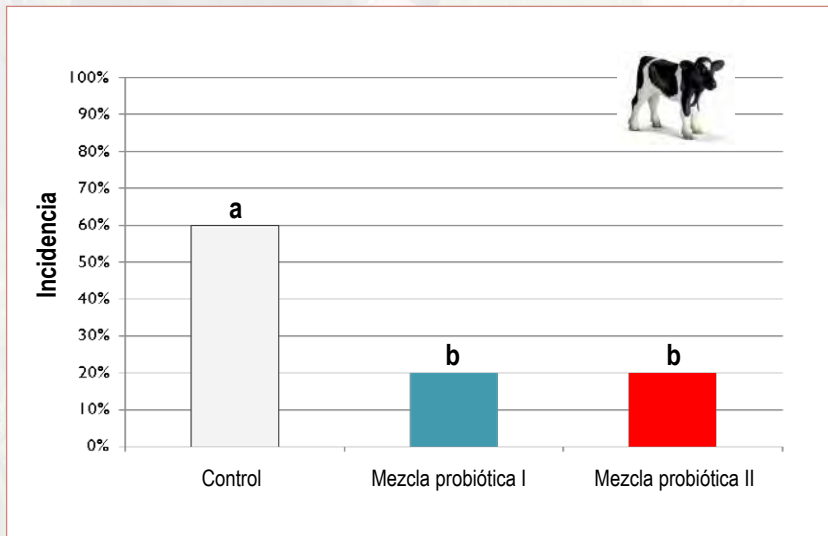


Figura 13. Reducción de la incidencia de diarreas en terneras por efecto del uso de mezclas microbianas ruminales con actividad probiótica ($P < 0,05$).

de sus componentes celulares. Cuando Bomba *et al.* (1995) inocularon ovinos gnotobióticos con *S. bovis*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvens* y *S. ruminatium*, encontraron un incremento significativo en la concentración de AGVs y de la actividad celulasa y celobiohidrolasa, lo cual devela la rápida capacidad de adaptación y colonización de los microorganismos ruminales y de su subsecuente actividad metabólica y enzimática en beneficio de su hospedero. La actividad amilasa y la capacidad adherente de *S. bovis* a las paredes ruminales han sido puestas en evidencia por Kmet *et al.* (1993), sugiriendo un potencial probiótico de este microorganismo en edades tempranas del rumiante.

Teóricamente, en términos de actividad probiótica y dada su previa adaptabilidad a las condiciones ruminales, especies microbianas aisladas de este órgano podrían tener mayores ventajas en comparación con microorganismos no nativos. A este respecto, Windschilt *et al.* (1991) no encontraron una influencia significativa en ganancia de peso corporal, consumo voluntario y crecimiento en terneros que recibieron un ingrediente probiótico compuesto por *S. faecium*, *S. cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* y *Aspergillus oryzae*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abea, F.; Ishibashia, N.; Shimamura, S. (1995). Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78:2838-2846.
- Akin, D.E.; Risby, L.L. (1987). Mixed fungal populations and lignocellulosic tissues degradation in the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1987-1995.
- Aldana, C.; Cabra, S.M.; Ospina, C.A.; Carvajal, F.; Rodríguez, F. (2009). Effect of a probiotic compound in rumen development, diarrhea incidence and weight gain in young Holstein calves. *WASET: World Academy of Sciences, Engineering and Technology.* 57: 510-513.
- Anderson, K.L.; Nagaraja, T.G.; Morrill, J.L.; Avery, T.B.; Galitzer, S.J.; Boyer, J.E. (1987). Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64:1215-1226.
- Beharka, A.A.; Nagaraja, T.G.; Morrill, J.L.; Kennedy, G.A.; Klemm, R.D. (1998). Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81:1946-55.
- Belanche, A.; Balcels, J.; De la Fuente, G.; Yañez-Ruiz, D.R.; Fondevila, M.; Calleja, L. (2010). Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 94:648-58.
- Berg, M.E.; Antonopoulos, D.A.; Rincón, M.T.; Band, M.; Bari, A.; Akraiko, T.; Hernández, A.; Thimmapuram, J.; Henrissat, B.; Coutinho, P.M.; Borovok, I.; Jindou, S.; Lamed, R.; Flint, H.J.; Bayer, E.A.; White, B.A. (2009). Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS One.* 4: e6650.
- Bergen, W.G.; Doulas B.; Bates, D.B. (1984). Ionophores: Their effect on production, efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.
- Biagi, G.; Piva, A.; Moschini, M.; Vezzali, E.; Roth, F.X. (2007). Performance, intestinal microflora and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. *J. Anim. Sci.* 85: 1184-1191.
- Bryant, M.P.; Robinson I.M. (1968). Effects of diet, time after feeding and position sampled on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 51:1950-1955.
- Cheng, K.J.; McAllister, T.A. (1997). Compartmentation in the rumen. In: P.N. Hobson and C.S. Stewart (Ed.). The rumen microbial ecosystem (p. 509). London, United Kingdom: Chapman & Hall.
- Cotta, M.A. (1988). Amyolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:772-776.
- Dawson, K.A.; Newman, K.E.; Boling, J.A. (1990). Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68: 3392-3398.
- Dehority, B.A. (1993). Microbial ecology of cell wall fermentation. In: Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield R.D y Ralph J. (Ed.). Forage cell wall structure and digestibility (pp. 425-453). Madison: ASA-CSSA-SSSA.
- Dehority, B.A. (1998). Microbial Interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 15:69-86.
- Fuller, R. (1989). A Review. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gebru, E.; Lee, J.S.; Son, J.C.; Yang, S.Y.; Shin, S.A.; Kim, B.; Kim, M.K.; Park, S.C. (2010). Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J. Anim. Sci.* 88: 3880-3886.
- Gong, J.; Forster, R.J.; Yu, H.; Chambers, J.R.; Sabour, P.M.; Wheatcroft, R.; Chen, S. (2002a). Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiology Letters.* 208: 1-7.
- Gong, J.; Forster, R.J.; Yu, H.; Chambers, J.R.; Sabour, P.M.; Wheatcroft, R.; Chen, S. (2002b). Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:171-179.

- Hobson, P.N. (1997). Introduction. In: P.N. Hobson and C.S. Stewart (Ed.). The rumen microbial ecosystem (pp. 1-9). London-New York: Elsevier.
- Hook, S.E.; Wright, A.D.; McBride, B.W. (2010). Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. 30: 945.
- Jun, H.S.; Qi, M.; Gong, J.; Egbosimba, E.E.; Forsberg, C.W. (2007). Outer membrane proteins of *Fibrobacter succinogenes* with potential roles in adhesion to cellulose and in cellulose digestion. *J. Bacteriol.* 189: 6806-6815.
- Karnati, S.K.R.; Yu, Z.; Sylvester, J.T.; Dehority, B.A.; Morrison, M.; Firkins J.L. (2003). Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J. Anim. Sci.* 81: 812-815.
- Kmet, V.; Flint, H.J.; Wallace, R.J. (1993). Probiotics and manipulation of rumen development and function. *Arch Tierernahr.* 441-0.
- Kung, L. (2001). Direct Fed Microbials and Enzymes for Ruminants. Department of Animal & Food Sciences, University of Delaware. http://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/articles/direct-fed_microbials_and_enzyme.html. Consulta: 17 de marzo de 2011.
- Kung, L.; Hession, A. (1995). Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *J. Anim. Sci.* 73: 250-256.
- Lukáša, F.; Koppová, I.; Kudrnáb, V.; Kope, J. (2007). Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol.* 52: 99-104.
- Mackie, R.I.; McSweeney C.S.; Klieve, A.V. (2002). Microbial ecology of the ovine rumen. In: Sheep Nutrition. M. Freer y H. Dove (Ed.). Chapter 4. CAB International.
- Martin, S.; Nisbet, J. (1992). Symposium: Direct-fed microbial and fermentation. Effect of direct-Fed microbials on rumen. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.
- Matsui, H.; Ban-Tokuda, T. (2008). Studies on carboxymethyl cellulase and xylanase activities of an aerobic fungal isolate CR4 from the bovine rumen. *Curr. Microbiol.* 57: 615-619.
- Miles, R.D.; Bootwalla, S.M. (1991). Direct-fed microbials in avian. In: Direct-fed microbials in animal production: A Review of Literature (p. 117). *Nat. Feed Ingrid. Assoc.* West Des Moines, IA.
- Muscato, T.V.; Tedeschi, L.O.; Russell, J. B. (2002). The Effect of ruminal fluid preparations on the growth and health *J. Dairy Sci.* 85: 648-656.
- Orpin, C.G.; Joblin, K.N. (1997). The rumen anaerobic fungi. In: Hobson, P.N. y Stewart, C.S. (Ed.). The Rumen Microbial Ecosystem (pp. 140-195). London: Chapman & Hall.
- Ospina, C.A.; Aldana, C.; Cabra, S.M.; Carvajal, F.; Rodríguez, F. (2009). Monitoring by quantitative real-time PCR of the establishment of *Prevotella bryantii* in young calves. *WASET: World Academy of Sciences, Engineering and Technology.* 57: 993-997.
- Owens FN.; Goetsch A.L. (1993). Fermentación Ruminal. En: El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición. D.C. Church (Ed.). Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Owens, FN.; Secrist, D.S.; Hill, W.J.; Gill, D. (1998). Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 275-286.
- Qi, M.; Nelson, K.E.; Daugherty, S.C.; Nelson, W.C.; Hance, I.R.; Morrison, M.; Forsberg, C.W. (2008). Genomic differences between *Fibrobacter succinogenes* S85 and *Fibrobacter intestinalis* DR7, identified by suppression subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 987-993.
- Rincón, M.T.; Dassa, B.; Flint, H.J.; Travis, A.J.; Jindou, S.; Borovok, I.; Lamed, R.; Bayer, E.A.; Henrissat, B.; Coutinho, P.M.; Antonopoulos, D.A.; Berg, M.E.; White, B.A. (2010). Abundance and diversity of dockerin-containing proteins in the fiber-degrading rumen bacterium, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS One.* 5: e12476.
- Rodríguez, F. (2003). Control of lactate accumulation in ruminants using *Prevotella bryantii*. Iowa State University, Ames, Iowa Doctoral Thesis.
- Rodríguez, F.; Rasmussen, M.A.; Allison, M.J. (2003). Control of lactate accumulation in goat acidosis model using *Prevotella bryantii*. USDA, Agricultural Research service, Ames, Iowa 50010, USA. PhD Thesis.
- Russell J.B.; Rychlik J.L. (2001). Factors that alter rumen microbiology. *Science.* 292: 1119-1122.
- Salinas-Chavira, J.; Lara-Juárez, A.; Gil-González, A.; Jiménez-Castro, J.; García-Castillo, R.; Ramírez-Bribiesca, E. (2010). Effect of breed type and ionophore supplementation on growth and carcass characteristic in feedlot hair lambs. *R. Bras. Zootec.* 39: 633-637.
- Stewart, C. S.; Flint, H. J.; y Bryant, M. P. (1997). The rumen bacteria. In: P.N. Hobson and C. S. Stewart (Ed.). The rumen microbial ecosystem (p. 10). London, United Kingdom: Chapman & Hall.
- Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant (p. 463). Ithaca, NY: Cornell University Press.

- Vandevoorde, K.; Christianenes, H.; Verstraete, W. (1991). In vitro appraisal of the probiotic val of intestinal lactobacilli. *World. J Microbiol.* In addition, *Biotechnol.* 7:587-592.
- Vlková, E.; Trojanová, I.; Rada, V. (2006). Distribution of Bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol.* 51: 325-328.
- Vogels, G.D.; Hoppe, W.F.; Stumm, C.K. (1980). Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 608-612.
- Wallace, R.J.; Newbold, C.J. (1993). Rumen fermentation and its manipulation: the development of yeast cultures as feed additives. In: Lyons T.P. (Ed.) *Biotechnology in the Feed industry* (pp.173-192). USA: *Proc Alltech 's 9 Annual Symposium.*
- Wanga, Y.H.; Xua, M.; Wanga, F.N.; Yua, Z.P.; Yaoa, J.H.; Zana, L.S.; Yanga F.X. (2009). Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. *Livestock Sci.* 122: 48-52.
- Watson, R.; Preedy, V. (Ed.). (2010). *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (p. 656). Academic Press.
- Weimer, P.J. (1998). Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114-3122.
- Williams, P.E.V.; Tait, C.A.G.; Innes, G.M.; Newbold, C.J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Dairy Sci.* 69: 3016-3026.
- Windschitl, P.M.; Randall, K.M.; Brainard, D.J. (2001). Performance of holstein dairy calves supplemented with a probiotic. Research Progress report. *FES publications.* Number 22.
- Wolin, M.J.; Miller, T.L.; Stewart, C.S. (1997). Microbe-microbe interactions, In: P.N. Hobson and C.S. Stewart (Ed.). *The rumen microbial ecosystem* (p. 471). London, United Kingdom: Chapman & Hall.
- Zhang, Y.; Gao, W.; Meng, Q. (2007). Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fibre particle size. *Arch. Anim. Nutr.* 61:114-125.